

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2002-214232

(43)Date of publication of application : 31.07.2002

(51)Int.Cl.

G01N 33/53
C12M 1/00
C12N 15/09
C12Q 1/68
G01N 21/64
G01N 21/78
G01N 33/543
G01N 33/566
G01N 35/02
G01N 35/04
G01N 37/00

(21)Application number : 2001-005285

(71)Applicant : TORAY IND INC

(22)Date of filing : 12.01.2001

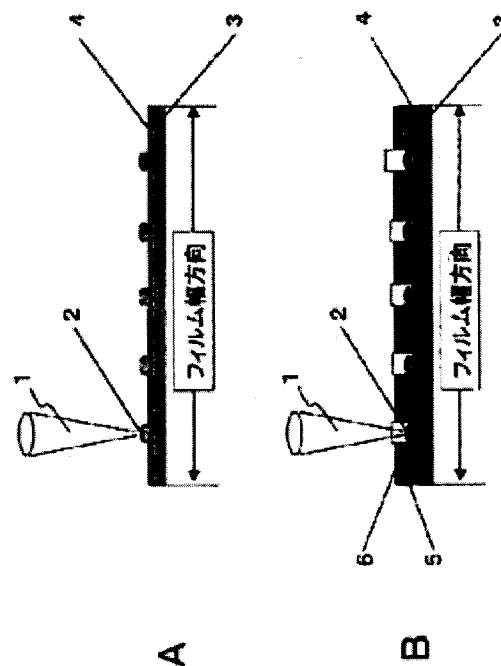
(72)Inventor : TSUNEKAWA TETSUYA
MIMURA TAKASHI
NAGAI HIROSHI

(54) SELECTIVELY-BONDING-SUBSTANCE-FIXED FILM AND METHOD FOR MEASURING
SUBSTANCE TO BE TESTED USING THE SAME

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a film to which a selectively bonding substance such as a nucleic acid is fixed suitable for accurately and speedily reading the results of measurement and used for measuring a substance to be tested and a method for measuring the substance to be tested using the same.

SOLUTION: In the film, a plurality of regions to which the selectively bonding substance is fixed are formed in density one or more and less than one hundred per square centimeter. The surface coarseness of the centerline of a film surface is equal to 1 nm or more and less than 150 nm in the selectively-bonding-substance-fixed film.



(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号
特開2002-214232
(P2002-214232A)

(43) 公開日 平成14年7月31日 (2002.7.31)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード* (参考)
G 0 1 N 33/53		G 0 1 N 33/53	M 2 G 0 4 3
C 1 2 M 1/00		C 1 2 M 1/00	A 2 G 0 5 4
C 1 2 N 15/09		C 1 2 Q 1/68	A 2 G 0 5 8
C 1 2 Q 1/68		G 0 1 N 21/64	F 4 B 0 2 4
G 0 1 N 21/64		21/78	C 4 B 0 2 9

審査請求 未請求 請求項の数12 O L (全 10 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2001-5285 (P2001-5285)

(22) 出願日 平成13年1月12日 (2001.1.12)

(71) 出願人 000003159

東レ株式会社

東京都中央区日本橋室町2丁目2番1号

(72) 発明者 恒川 哲也

滋賀県大津市園山一丁目1番1号 東レ株式会社滋賀事業場内

(72) 発明者 三村 尚

滋賀県大津市園山一丁目1番1号 東レ株式会社滋賀事業場内

(74) 代理人 100088546

弁理士 谷川 英次郎

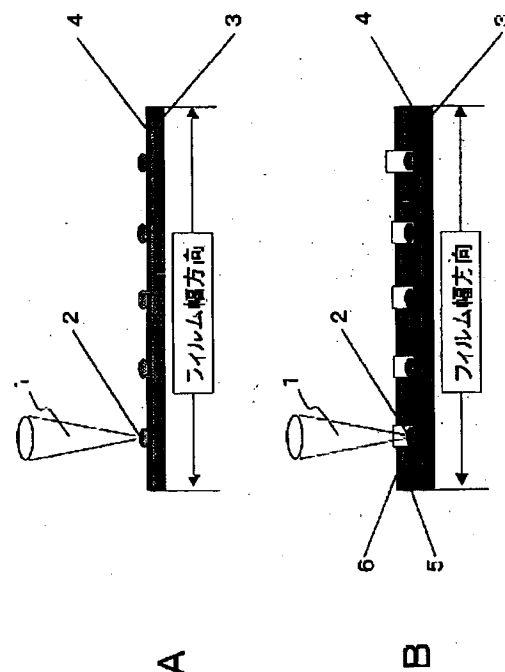
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 選択結合性物質固定化フィルム及びそれを用いた被検物質の測定方法

(57) 【要約】

【課題】 測定結果を正確かつ迅速に読みとることに適した、被検物質の測定に用いられる、核酸等の選択結合性物質を固定化したフィルム及びそれを用いた被検物質の測定方法を提供すること。

【解決手段】 選択結合性物質を固定化した領域が1 cm² あたり1個以上、100個未満の密度で複数形成されているフィルムであって、フィルム表面の中心線表面粗さが1 nm以上、150 nm未満である、選択結合性物質固定化フィルムを提供した。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 選択結合性物質を固定化した領域が1 cm² あたり1個以上、100個未満の密度で複数形成されているフィルムであって、フィルム表面の中心線表面粗さが1 nm以上、150 nm未満である、選択結合性物質固定化フィルム。

【請求項2】 前記選択結合性物質が、核酸、タンパク質、糖類又は抗原性化合物である請求項1記載のフィルム。

【請求項3】 前記選択結合性物質が、核酸、抗体又は抗原である請求項2記載のフィルム。

【請求項4】 前記選択結合性物質を固定化した領域1個当たりの面積が、0.001 mm²以上、2.0 mm²未満である請求項1ないし3のいずれか1項に記載のフィルム。

【請求項5】 前記選択結合性物質を固定化した領域1個当たりの面積が、0.01 mm²以上、1.0 mm²未満である請求項4記載のフィルム。

【請求項6】 フィルム表面の表面自由エネルギーに分布がある請求項1ないし5のいずれか1項に記載のフィルム。

【請求項7】 前記選択結合性物質を固定化した領域が、該領域以外の部分に比べて親水性が高い請求項6記載のフィルム。

【請求項8】 前記選択結合性物質を固定化した領域が、凹型に形成されている請求項1ないし7のいずれか1項に記載のフィルム。

【請求項9】 選択結合性物質を固定化した複数の領域のそれぞれには1種類ずつの選択結合性物質が固定化され、フィルム全体で複数の選択結合性物質が固定化されている請求項1ないし8のいずれか1項に記載のフィルム。

【請求項10】 請求項1ないし9のいずれか1項に記載のフィルム上に固定化された選択結合性物質を、標識化された被検物質と接触させる工程と、固定化物質と被検物質を相互作用させる工程と、フィルムを走行させ、標識材料からの信号を検出する工程を含む被検物質の測定方法。

【請求項11】 前記標識材料は、蛍光物質であり、前記信号の検出は、フィルムに励起放射光の下を走行させて行う請求項10記載の方法。

【請求項12】 固定化物質と、標識化された被検物質を接触させる工程は、被検物質を含む液をコーターにより前記フィルム上に塗布することにより行われる請求項10又は11記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、選択結合性物質固定化フィルム及びそれをを用いた被検物質の測定方法に関する。

【0002】

【従来の技術】近年、各種生物におけるゲノムプロジェクトが進められており、ヒト遺伝子をはじめとして、多数の核酸、蛋白、糖鎖などのポリマーが急速に明らかにされつつある。配列の明らかにされたポリマーの機能については、各種の方法で調べることができるが、その有力な方法の一つとして、明らかにされたポリマー配列情報を利用して生体機能発現との関係を調べることが進められている。

【0003】しかし、極めて多数の遺伝子から構成される複雑な反応系全体からみると、遺伝子の総合的・系統的解析を行うことは困難である。そこで、マイクロアレイ又はチップと呼ばれる平面基板片上に、多数の核酸が高密度に整列固定化されたものが用いられることにより総合的・系統的解析が進められている。多数かつ複雑な反応系の解析を行うためには、測定の高速化、高感度化の開発が重要な位置づけにある。

【0004】このような方法の具体的例としては、例えば研究対象細胞の発現生体成分等を蛍光色素等で標識したサンプルを平面基板片上で相互作用させ、その箇所を蛍光色素等でラベル後、高解像度解析装置で高速に読みとる方法が挙げられる。こうして、サンプル中のそれぞれの生体成分量を迅速に推定できる。即ち、この新しい方法の本質は、基本的には反応試料の微量化と、その反応試料を再現性よく多量・迅速・系統的に分析、定量しうる形に配列・整列する技術との統合である。

【0005】核酸を基板上に固定するための技術としては、ナイロンメンブレン等の上に高密度に固定化する方法の他、更に密度を高めるため、ガラス等の基板の上にポリリジン等をコーティングして固定化する方法、核酸を固定化した繊維を束ねて三次元構造体としての繊維束を作成し、切片化プロセスを経て二次元配列体を得る方法、あるいはシリコン等の基板の上に短鎖の核酸を直接固相合成していく方法などが開発されている。しかし、従来の手法は、いずれも核酸を高密度に固定化することを基本思想としているため、一般に核酸のスポット径が小さく、複数の核酸が隣接するため、検出精度を高めにくく、再現性の良いデータが必ずしも得られないという問題があった。この問題は核酸の鎖長が長い場合により顕著であった。また、シート法においてスポット密度を低くした場合、ハイブリダイゼーション反応を進行させる際に多量の検体溶液が必要になるため検査効率が悪化するという問題があり、スポット密度を低くした場合でも、検体溶液を核酸に効率良く接触させ、ハイブリダイゼーションを効率良く行う手法が確立されていなかった。

【0006】高解像度解析装置で高速に読みとるためには、例えば宝酒造株式会社製DNAチップ解析装置 G MSTM418 Array Scannerのように、基板表面で励起放射光を走査させて標識材料からの蛍光を検出する方法が採られており、基板の形状としては一般

的には四角形で、その上を効率よく、高速に励起放射光を走査することが工夫されている。しかし、このような検出方法においても、前記のように核酸を高密度に固定化していることに起因する検出エラーの発生を克服できていないのが当該分野の現状である。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】従って、本発明の目的は、測定結果を正確かつ迅速に読みとることに適した、被検物質の測定に用いられる、核酸等の選択結合性物質を固定化したフィルム及びそれを用いた被検物質の測定方法を提供することである。

【0008】

【課題を解決するための手段】本発明者等は、上述の如き課題を解決すべく、鋭意検討を重ねた。その結果、中心線表面粗さが1 nm以上、150 nm未満であるフィルム上に、選択結合性物質を固定化した領域が1 cm²あたり1個以上、100個未満の密度で複数形成することにより、上記目的を達成することができることを見出し、本発明を完成した。

【0009】すなわち、本発明は、選択結合性物質を固定化した領域が1 cm²あたり1個以上、100個未満の密度で複数形成されているフィルムであって、フィルム表面の中心線表面粗さが1 nm以上、150 nm未満である、選択結合性物質固定化フィルムを提供する。また、本発明は、前記本発明のフィルム上に固定化された選択結合性物質を、標識化された被検物質と接触させる工程と、固定化物質と被検物質を相互作用させる工程と、フィルムを走行させ、標識材料からの信号を検出する工程を含む被検物質の測定方法を提供する。

【0010】

【発明の実施の形態】以下、本発明を詳細に説明する。本発明において、支持体として用いられるフィルムは、有機または無機材料からなるフィルムであれば、如何なるフィルムでも良いが、入手簡便性、コストの観点から、有機高分子からなるフィルムが好ましい。具体的には、ポリエチレンテレフタレート、ポリブチレンテレフタレート、ポリエチレン-2, 6-ナフタレート、ポリシクロヘキサントレフタレートなどのポリエステル系フィルム、ナイロン6、ナイロン66、ナイロン12等のナイロン系フィルム、ポリエチレン、ポリプロピレン等のポリオレフィン系フィルム、ポリフェニレンスルフィド、ポリイミド、ポリアミドイミド、ポリ芳香族アミド、ポリカーボネート、ポリエーテルエーテルケトン等のエンジニアリング系フィルム、液晶ポリマー系フィルムおよびポリ乳酸などの生分解ポリマーからなるフィルムが挙げられるが、本発明では、熱寸法安定性、コスト等の観点からポリエステル系フィルムが好ましく、エチレンテレフタレートを主成分とするポリエステルフィルムが最も好ましい。本発明のフィルムは、無延伸でも延伸フィルムでも良いが、少なくとも一方向に延伸配向させたフィ

ルムが好ましく、二軸配向フィルムがより好ましい。

【0011】支持体フィルムの厚みは、特に限定されないが、加工性、測定時のフィルムの取扱性の観点から、1 μm以上、1 mm以下が好ましい。より好ましいフィルム厚みは、5 μm以上、200 μm以下であり、10 μm以上、150 μm以下が最も好ましい。

【0012】支持体フィルムの形状は、特に限定されないが、テープ状であることが好ましく、テープ状のフィルムを適宜巻取り、また巻出して使用すると、選択結合性物質の固定化ならびに測定時に有効である。この場合、テープは巻き取れるように連続的なものであってもよく、短冊状に不連続であっても良い。テープのサイズは幅0.3～10 cmが好ましく、テープの長さは10～50000 cmが好ましい。

【0013】選択結合性物質を固定化する、支持体フィルム表面の中心線表面粗さは1 nm以上、150 nm未満である。ここでいう「フィルム表面」とは、フィルムの表面と裏面の内、選択結合性物質を固定した側のフィルム表面全体の平均表面粗さRaである。表面粗さが1 nm未満ではフィルムの滑り性が不十分であるため、本発明のフィルム走行時にシワが発生して、標識物質の検出に支障を来す場合がある。また、フィルムの中心線表面粗さが150 nm以上であると、固定化した選択結合性物質と標識化された検体を接触させる工程で多量の検体溶液が必要となり、またテープ状のフィルムを走行させた時にフィルムの表面突起によって固定化した選択結合性物質に破損が生じたりするので好ましくない。フィルム表面の中心線表面粗さは3 nm以上、50 nm未満がより好ましい。

【0014】フィルムの中心線表面粗さは、無機粒子や有機粒子をフィルムに添加することにより制御可能である。無機粒子の具体例としては、酸化ケイ素、酸化アルミニウム、酸化マグネシウム、酸化チタンなどの酸化物、カオリン、タルク、モンモリロナイトなどの複合酸化物、炭酸カルシウム、炭酸バリウムなどの炭酸塩、硫酸カルシウム、硫酸バリウムなどの硫酸塩、チタン酸バリウム、チタン酸カリウムなどのチタン酸塩、リン酸第3カルシウム、リン酸第2カルシウム、リン酸第1カルシウムなどのリン酸塩などを用いることができるが、これらに限定されるわけではない。また、これらは目的に応じて2種以上用いてもかまわない。有機粒子の具体例としては、ポリスチレンもしくは架橋ポリスチレン粒子、スチレン・アクリル系およびアクリル系架橋粒子、スチレン・メタクリル系およびメタクリル系架橋粒子などのビニル系粒子、ベンゾグアナミン・ホルムアルデヒド、シリコーン、ポリテトラフルオロエチレンなどの粒子を用いることができるが、これらに限定されるものではなく、粒子を構成する部分のうち少なくとも一部がポリエステルに対して不溶の有機高分子微粒子であれば如何なる粒子でも良い。また有機粒子は、易滑性、フィル

ム表面の突起形成の均一性から粒子形状が球形状で均一な粒度分布のものが好ましい。本発明のフィルムには、前記粒子以外に各種添加剤、例えば酸化防止剤、帯電防止剤、結晶核剤などを本発明の効果が損なわれない程度の少量であれば添加することができる。上記粒子の粒径、配合量、形状などは適宜選ぶことが可能であるが、平均粒子径としては $0.01\mu\text{m}$ 以上、 $3\mu\text{m}$ 以下が好ましく、 $0.03\mu\text{m}$ 以上、 $1.0\mu\text{m}$ 以下がさらに好ましい。粒子の添加量は、フィルム全体の重量の 0.01 重量%以上、 10 重量%以下が好ましく、 0.03 重量%以上、 3 重量%以下がさらに好ましい。

【0015】本発明では、フィルムの構成は単膜、積層のいずれの構成でも良いが、フィルム中の粒子の粒径、添加量を適宜変更して、フィルム表裏の表面粗さを制御する場合には、積層構成を好ましく使用することができる。

【0016】上記支持体フィルム上の複数の領域には、選択結合性物質が固定されている（選択結合性物質が固定されている領域を、便宜的に、以下「固定化領域」ということがある）。ここで、「選択結合性物質」とは、被検物質と直接的又は間接的に、選択的に結合し得る物質を意味し、代表的な例として、核酸、タンパク質、糖類及び他の抗原性化合物を挙げることができる。核酸は、DNAでもRNAでもよい。特定の塩基配列を有する一本鎖核酸は、該塩基配列又はその一部と相補的な塩基配列を有する一本鎖核酸と選択的にハイブリダイズして結合するので、本発明でいう「選択結合性物質」に該当する。また、タンパク質としては、抗体及びFabフラグメントや $F(ab')_2$ フラグメントのような、抗体の抗原結合性断片、並びに種々の抗原を挙げることができる。抗体やその抗原結合性断片は、対応する抗原と選択的に結合し、抗原は対応する抗体と選択的に結合するので、「選択結合性物質」に該当する。糖類としては、多糖類が好ましく、種々の抗原を挙げることができる。また、タンパク質や糖類以外の抗原性を有する物質を固定化することもできる。「選択結合性物質」として、特に好ましいものは、核酸、抗体及び抗原である。本発明に用いる選択結合性物質は、市販のものでもよく、また、生細胞などから得られたものでもよい。

【0017】生細胞からのDNA又はRNAの調製は、公知の方法、例えばDNAの抽出については、Blinらの方法（Blin et al., Nucleic Acids Res. 3: 2303 (1976)）等により、また、RNAの抽出については、Favaloroらの方法（Favaloro et al., Methods Enzymol. 65: 718 (1980)）等により行うことができる。固定化する核酸としては、更に、鎖状若しくは環状のプラスミドDNAや染色体DNA、これらを制限酵素により若しくは化学的に切断したDNA断片、試験管内で酵素等により合成されたDNA、又は化学合成したオリゴヌクレオチド等

を用いることもできる。

【0018】支持体フィルム上に形成される上記固定化領域の密度は、 1cm^2 あたり1個以上、 100 個未満であり、好ましくは 20 個以上、 80 個未満である。固定化領域の密度が 1cm^2 あたり1個未満であると検体溶液と選択結合性物質の接触が難しくなり、また一方、固定化領域の密度を 1cm^2 あたり 100 個以上に高くすると、従来技術同様の問題が露呈し、検出精度・再現性に問題が生じて本発明の目的を達成できなくなる。

【0019】固定化領域1個当たりの面積は、検出感度、検出再現性の観点から、 0.001mm^2 以上、 2.0mm^2 未満であることが好ましく、 0.01mm^2 以上、 1.0mm^2 未満がより好ましく、 0.02mm^2 以上、 0.5mm^2 未満が最も好ましい。尚、ここで言う面積とは、下記微小凹部を有したフィルムの場合には、フィルム上面から見た場合の微小凹部の面積である。また、1個の固定化領域の形状は特に限定されず、円形、楕円形、角形および不定形のいずれの形状であっても良い。また、固定化領域は、例えば図2中の7で示すように整列して配置することができる。

【0020】単一の固定化領域には、通常、1種類の選択結合性物質が固定化されるが、例えば、変異を有する複数種類の遺伝子を同一の固定化領域に結合させたい場合等には、単一の固定化領域に複数種類の選択結合性物質を固定化することも可能である。

【0021】また、複数の固定化領域に固定される選択結合性物質は、それぞれ異なる種類の選択結合性物質としても、同一の選択結合性物質としても構わない。また、複数の固定化領域のうち、一部の複数の固定化領域に1種類の選択結合性物質を固定化し、他の一部の複数の固定化領域に他の1種類の選択結合性物質を固定化することができる。選択結合性物質の種類、順序は位置によって限定されるものでない。同一の選択結合性物質を複数箇所に固定化しておき、測定感度をより高くすることも有効である。

【0022】本発明では、フィルム表面において、検体溶液と選択結合性物質の接触を効果的に進行させるために、フィルム表面の表面自由エネルギーに分布が形成されるように表面処理することが好ましい。例えば、固定化領域以外のフィルム表面の親水性を低下させて検体溶液と接触しにくいようにしておくと、ハイブリダイゼーション反応や免疫反応をさせる際に検体溶液と選択結合性物質が選択的に接触しやすくなるからである。具体的には、フィルム表面全面を疎水化処理した後、マスクを使用して選択結合性物質を固定化する部分のみをコロナ処理、火炎処理したり、 γ 線、電子線、紫外線、レーザー、プラズマ等の照射によって表面を改質する方法が挙げられるが、これらの方法に特に限定されない。また、上記疎水化処理は、オレフィン系、シリコン系、フッ素系などの疎水性表面形成ポリマーを有機溶媒あるいは

は水に溶解あるいは分散させた材料をインラインおよびオフラインで塗布する方法が一般的であるが、疎水性ポリマーを共押出法によってフィルム表面を疎水性とする方法も好ましく用いることができる。ここで、塗布厚みまた積層厚みは $0.01\mu\text{m}$ 以上、 $10\mu\text{m}$ 以下とすることが好ましい。疎水化処理後のフィルムの表面自由エネルギーは、検体溶液を選択結合性物質と効果的に接触させる観点から、 40mN/m 以下にしておくことが好ましく、 35mN/m 以下がさらに好ましく、 30mN/m 以下が最も好ましい。また、選択結合性物質を固定化する位置と固定化しない位置との表面自由エネルギーの差は、 5mN/m 以上、 50mN/m 以下が好ましく、 10mN/m 以上、 30mN/m 以下がより好ましい。

【0023】本発明では、図1Bに示すように、選択結合性物質を効率良く固定するためにフィルム表面に凹形状の微少な凹部を形成させておくことが好ましい。フィルム表面にこのような微小凹部を形成しておくこと、選択結合性物質と検体溶液との接触を効果的に進めることができ、また、検出工程でフィルムを繰返し走行させる際にも検体の損傷を抑制し、本発明で目的とするフィルムが得られ易くなる。微小凹部の形状は円形、楕円形、角形および不定形のいずれの形状であっても良く、選択結合性物質を固定化するに十分な容積を有していれば、特に限定されない。この場合、図1Bに示すように、前述の表面処理を併用して、選択結合性物質を固定化する微小凹部以外のフィルム表面を疎水化しておき、検体溶液に対する親和性を低下させておくと、検体溶液が微小凹部部分に移動し易くなり、被検物質と選択結合性物質の接触が効果的に進行するので有効である。フィルムに微小凹部を作成する方法は特に限定されず、感熱ヘッド、火炎処理による穿孔などの公知の手法を適用できる。本発明では、感熱ヘッドでフィルムを一部融解させて貫通孔を形成させた穿孔フィルムB（図1Bにおける5）を基材フィルムA（図1Bにおける3）にラミネートして熱融着させる方法が好ましい。本手法によれば、フィルムAとフィルムBの表面の滑り性および表面自由エネルギーを個別に制御しやすく、微小凹部とそれ以外のフィルム表面の表面自由エネルギーに差異を付けることが容易であるため有効である。なお、微小凹部の深さは、特に限定されないが、通常、 $1\sim 50\mu\text{m}$ 程度が好ましい。

【0024】本発明のフィルムには、固定化領域の近傍に、適宜、位置情報を記録することができる。この場合、位置情報は選択結合性物質を固定するフィルム面とは反対側のフィルム表面でも良く、位置情報は印字、凹凸など如何なる形態でも構わない。このような位置情報を記録しておくこと、その固定化領域に何が固定化されているのか判定できる。

【0025】支持体フィルムの表面は、無処理の状態で

そのまま用いてもよいが、必要に応じて、図1Aに示すように、表面処理を施すのが好ましい。例えば、反応性官能基を表面に導入したフィルムであってもよく、また、プラズマ処理や γ 線、電子線などの放射線処理を施したフィルムであってもよい。これらフィルムに選択結合性物質を固定する場合には、フィルムと選択結合性物質との間における各種化学的又は物理的な相互作用、すなわちフィルムが有している官能基と、選択結合性物質を構成する成分との間の化学的又は物理的な相互作用を利用することができる。

【0026】選択結合性物質の支持体フィルム上への固定は、公知の方法により行うことができ、適宜、位置決めして選択結合性物質を固定できる。無修飾の選択結合性物質をフィルムに固定する場合には、選択結合性物質とフィルムとを作用させた後、ベーキングや紫外線照射により固定できる。後述の実施例では、この方法によりDNAをポリエチレンテレフタレート(PET)に固定している。また、アミノ基で修飾された選択結合性物質をフィルムに固定する場合には、グルタルアルデヒドや1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(EDC)等の架橋剤を用いてフィルムの官能基と結合させることができる。選択結合性物質を含む試料をフィルムに作用させる際の温度は、 $5^{\circ}\text{C}\sim 95^{\circ}\text{C}$ が好ましく、 $15^{\circ}\text{C}\sim 65^{\circ}\text{C}$ が更に好ましい。処理時間は通常5分～24時間であり、1時間以上が好ましい。

【0027】本発明では、選択結合性物質をそのままフィルムに固定化してもよく、また、選択結合性物質に化学的修飾を施した誘導体や、必要に応じて変性させた核酸を固定化してもよい。核酸の化学的修飾には、アミノ化、ビオチン化、ディゴキシゲニン化等が知られており[Current Protocols In Molecular Biology, Ed.; Frederick M. Ausubel et al. (1990)、脱アイソトープ実験プロトコール(1)DIGハイブリダイゼーション(秀潤社)]、本発明ではこれらの修飾法を採用することができる。一例として、核酸へのアミノ基導入に関して説明する。アミノ基を有する脂肪族炭化水素鎖と一本鎖核酸との結合位置は特に限定されるものではなく、核酸の5'末端または3'末端のみならず核酸の鎖中(例えば、リン酸ジエステル結合部位または塩基部位)であってもよい。この一本鎖核酸誘導体は、特公平3-74239号公報、米国特許4,667,025号、米国特許4,789,737号等に記載の方法にしたがって調製することができる。この方法以外にも、例えば、市販のアミノ基導入用試薬[例えば、アミノリンクII(商標名); PEバイオシステムズジャパン社、Amino Modifiers(商標名); クロンテック社]などを用いて、又はDNAの5'末端のリン酸にアミノ基を有する脂肪族炭化水素鎖を導入する周知の方法(Nucleic Acids Res., 11(18), 6513-(1983))にしたがって調製することができる。

【0028】上述の方法により得られた選択結合性物質

固定化フィルムは、選択結合性物質を固定した後、適当な処理をすることができる。例えば、熱処理、アルカリ処理、界面活性剤処理などを行うことにより、固定された選択結合性物質を変性させることもできる。あるいは、細胞、菌体などの生体材料から得られた選択結合性物質を使用する場合は、不要な細胞成分などを除去してもよい。そして、処理後のフィルムを選択結合性物質の検出材料として用いることができる。なお、これらの処理は別々に実施してもよく、同時に実施してもよい。また、選択結合性物質を含む試料をフィルムに固定する前に適宜実施してもよい。

【0029】選択結合性物質を固定化した本発明のフィルムは、固定化された選択結合性物質をプローブとして被検物質と相互作用させることにより、検体中の特定の被検物質を検出することができる。2種類の被検試料に対して、下記に示す標識化（区別が付くように）を行い、その差異を比較することもできる。

【0030】相互作用した選択結合性物質を含む被検物質の検出には、相互作用を特異的に認識することができる公知の手段を用いることができる。例えば、検体中の選択結合性物質に、蛍光物質、発光物質、ラジオアイソトープなどの標識体を作用させ、この標識体を検出することができる。これら標識体の種類や標識体の導入方法等に関しては、何ら制限されることはなく、従来公知の各種手段を用いることができる。

【0031】さらに、本発明は、フィルム上に固定化された選択結合性物質を、標識化された被検物質と接触させる工程と、固定化物質と被検物質を相互作用させる工程と、フィルムを走行させ、標識材料からの信号を検出する工程を含む被検物質の測定方法をも提供するものであるが、これらの各工程で、適宜フィルムを走行させる場合に本発明で開示するフィルムが有効である。各工程でフィルムを移動走行させる速度は特に限定されず、例えば検出工程でフィルムを走行させる速度は検出器の速度応答限界以内であれば構わない。本発明におけるフィルム走行速度は、各工程でのトラブル発生防止と検査効率アップを両立する観点から、1m/分～1000m/分が好ましく、5m/分～100m/分がより好ましい。

【0032】本発明の方法に供せられる被検物質としては、測定すべき核酸、例えば、病原菌やウイルス等の遺伝子や、遺伝病の原因遺伝子等並びにその一部分、抗原性を有する各種生体成分、病原菌やウイルス等に対する抗体等を挙げることができるが、これらに限定されるものではない。また、これらの被検物質を含む検体としては、血液、血清、血漿、尿、便、髄液、唾液、各種組織液等の体液や、各種飲食物並びにそれらの希釈物を挙げることができるがこれらに限定されるものではない。また、被検物質となる核酸は、血液や細胞から常法により抽出した核酸を標識してもよいし、該核酸を鋳型とし

て、PCR等の核酸増幅法によって増幅したものであってもよい。後者の場合には、測定感度を大幅に向上させることが可能である。核酸増幅産物を被検物質とする場合には、蛍光物質等で標識したヌクレオシド三リン酸の存在下で増幅を行うことにより、増幅核酸を標識することが可能である。また、被検物質が抗原又は抗体の場合には、被検物質である抗原又は抗体を常法により直接標識してもよいし、被検物質である抗原又は抗体を選択結合性物質と結合させた後、フィルムを洗浄し、該抗原又は抗体と抗原抗体反応する標識した抗体又は抗原を反応させ、フィルムに結合した標識を測定することもできる。このように、被検物質と特異的に結合する標識化物質を後から反応させて被検物質を標識する場合も、結果的に被検物質が標識されているのと同じことになるから、本発明で言う「標識化された被検物質」に含めて解釈する。

【0033】フィルムに固定化された選択結合性物質に標識材料を付加した被検物質を接触させる方法は特に限定されないが、本発明では検体溶液を塗布した後、カバーシートやフィルムをラミネートし、選択結合性物質と検体溶液を接触させる方法を適用するのが有効である。検出溶液を本発明のフィルムに塗布する方法としては、ダイコーター、バーコーター、ロールコーター、ディップコーター、ナイフコーター、液だまりへの接触など、公知の塗布方法を適用することができるが、本発明では、図3または図4に示すような高精度マイクロシリンジポンプを具備したコーティングダイによる塗布が少量の検出溶液を無駄なく均一に塗布する観点で好ましい。本発明では、図3または図4に示した枚葉型または連続型塗工装置に公知のラミネート装置を組み合わせ、検体溶液を塗布した直後にラミネートすることも好ましく行うことができる。なお、図3及び図4中、8は選択結合性物質固定化フィルム、9は高精度マイクロシリンジポンプ、10はコーティングダイ、11は移動テーブル、12は巻出リール、13は巻取リールを示す。

【0034】固定化物質と被検物質を相互作用させる工程は、従来と全く同様に行うことができる。反応温度及び時間は、ハイブリダイズさせる核酸の鎖長や、免疫反応に関与する抗原及び／又は抗体の種類等に応じて適宜選択されるが、核酸のハイブリダイゼーションの場合、通常、50℃～70℃程度で1分間～数時間、免疫反応の場合には、通常、室温～40℃程度で1分間～数時間程度である。

【0035】標識材料には、例えば蛍光材料を用いることができる。この蛍光材料の励起波長の励起放射光を用いることにより、高感度な検出が得られる。2種類以上の蛍光材料を用いても構わない。この場合、励起放射光もそれぞれに合わせた波長の光を用いることが望ましい。

【0036】また、本発明では、検出精度を高めるため

に、核酸のハイブリダイゼーションの前に、アレハイブリダイゼーション、すなわち、非特異的な吸着を抑えるために検体とは異なるDNAを入れてハイブリダイゼーションと同様なことを適宜行うこともできる。

【0037】上記方法により、固定化された選択結合性物質と選択的に結合する核酸や抗体、抗原等の被検物質を測定することができる。すなわち、選択結合性物質として核酸を固定化した場合には、この核酸又はその一部と相補的な配列を相補的な配列を有する核酸を測定することができる。また、選択結合性物質として抗体又は抗原を固定化した場合には、この抗体又は抗原と免疫反応する抗原又は抗体を測定することができる。なお、本明細書でいう「測定」には検出と定量の両者が包含される。

【0038】物性の評価方法

1. 中心線平均表面粗さRa

(株)小坂研究所製の高精度薄膜段差計ET-10を用いて、測定してJISB0601に準じて中心線平均表面粗さ(Ra)を求めた。触針先端半径0.5μm、針圧5mg、測定長1mm、カットオフ0.08mmとした。単位はnmで示す。

【0039】2. 表面自由エネルギー

JIS K-6788に従って測定した。単位はmN/mで示す。

【0040】

【実施例】本発明を以下の実施例によって更に詳細に説明する。但し、本発明はこれら実施例によりその技術的範囲が限定されるものではない。

【0041】参考例1

ここではPETによる基材フィルムの製法を示す。ポリエチレンテレフタレート(PET)(固有粘度0.65、平均粒径0.3μmの球状架橋ポリスチレン粒子0.25重量%配合)を180℃で3時間真空乾燥し、280℃に加熱された押出機に供給し、Tダイよりシート状に吐出させた後、表面温度25℃の冷却ドラム上に静電気力で密着させて冷却固化し、未延伸フィルムを得た。

【0042】次いで、この未延伸フィルムを、加熱された複数のロール群からなる縦延伸機を用い、ロールの周速差を利用して、95℃の温度でフィルムの縦方向に3.5倍の倍率で延伸した。その後、フィルムの両端部をクリップで把持して、テンターに導き、延伸温度100℃、延伸倍率3.7倍でフィルムの幅方向に延伸し、225℃の温度で熱処理を行った。引き続き、100℃にコントロールされた冷却ゾーンで幅方向に1%弛緩処理を施した後、室温まで冷却し、フィルムエッジを除去し、巻き取った。フィルム厚みは押出量を調節して75μmとした。ここで得られたフィルムの中心線表面粗さは10nmであった。

【0043】参考例2

長手方向に延伸したフィルムに、空気中でコロナ放電処理を施し、その処理面に三井化学社製ポリオレフィン水性ディスパーション(ケミパール M-200)の水溶液(固形分濃度3%)を最終フィルム状態での積層厚みが0.1μmとなるように塗布した後に幅方向に延伸する以外は参考例1と同様に製膜し、フィルムの片面を疎水化処理した厚み75μmの二軸配向フィルムを得た。次いで、DNA固定部を開孔部として有するマスクを使用して、疎水化したフィルム表面をコロナ放電処理して、DNA固定部を親水化した。ここで得られたフィルムの中心線表面粗さは12nmであった。また、疎水化したフィルム表面の表面自由エネルギーは38mN/mであり、フィルム表面の疎水部とDNA固定部の表面自由エネルギー差は12mN/mであった。

【0044】参考例3

ここではフィルムの片面を疎水化処理した穿孔フィルムの製法を示す。PETとポリエチレンイソフタレート(PET/I)共重合体(ガラス転移点75℃、融点215℃、共重合比80/20、平均径0.8μmの凝集シリカを0.2重量%配合)のペレットを120℃で3時間真空乾燥して予備結晶化した後、180℃で3時間真空乾燥し、270℃に加熱された押出機に供給し、Tダイよりシート状に吐出した。さらにこのシートを表面温度25℃の冷却ドラム上に静電気力で密着させて冷却固化し、未延伸キャストフィルムを得た。次いで、この未延伸フィルムを加熱された複数のロール群に導き、95℃の温度で長手方向に延伸し、空気中でコロナ放電処理を施し、その処理面に三井化学社製ポリオレフィン水性ディスパーション(ケミパール M-200)の水溶液(固形分濃度3%)を最終フィルム状態での積層厚みが0.1μmとなるように塗布した後、フィルムをクリップで把持してテンターに導き、延伸温度90℃、延伸倍率3.7倍でフィルムの幅方向に延伸し、110℃の温度で熱処理を行った後、室温まで冷却し、フィルムエッジを除去し、フィルム厚み25μmの二軸配向フィルムを得た。次いで、ここで得た二軸配向フィルムを印加エネルギー0.30mJのサーマルヘッドにより穿孔して、孔径0.5mmφの貫通孔を70個/cm²の密度で有する穿孔フィルムを得た。ここで得られたフィルムの中心線表面粗さは35nmであり、疎水化した表面の表面自由エネルギーは37mN/mであった。

【0045】実施例1

まず参考例2のフィルムを用いてDNAを固定化した。それぞれ市販されているDNA溶液A(ヒトβアクチン遺伝子)、B(ヒトグリセルアルデヒド3リン酸脱水酵素)、C(ヒトインターフェロンβ遺伝子)、D(ヒトインターロイキン-6遺伝子)、E(ヒトインターロイキン-8遺伝子)(各溶液中のDNA濃度:1mg/ml)を95℃で3分間熱処理後、宝酒造(株)製DNAチップ作製装置 GMSTM417 Arrayerを用

いて、10個ずつスポッティングした。この際のDNA固定化領域は 1 cm^2 あたり70個で、大きさは $0.25\text{ mm}\phi$ とし、参考例2記載の親水化処理した位置に合わせて規則的にDNAを固定化した。その後、空气中で乾燥し、スポッティングしたDNAの位置が $0.5\text{ mm}\phi$ の開口部に一致するようにフォトマスクを充てて紫外線を照射することにより、DNAサンプルを固定した。ここで得られたDNA固定化フィルムのDNA固定側の表面の中心線表面粗さは 12 nm であった。

【0046】一方、2種類の核酸蛍光標識化試薬Cy3およびCy5を用いて、DNA溶液Aの相補配列とDの相補配列を持つDNAを標識化した。これらの標識化DNAを検体溶液とし、高精度マイクロシリンジポンプを具備したコーティングダイを使用して、前記フィルムに検体溶液を厚み $10\text{ }\mu\text{m}$ の厚さで塗布し、その後、続いて、厚み $50\text{ }\mu\text{m}$ のポリエステル製カバーフィルムをラミネートした。その後、このフィルムを 65°C 、4時間放置し、固定化選択結合性物質と検体試料をハイブリダイゼーションさせた後、カバーシートを取り除き、フィルム表面を洗浄バッファーにより室温で数回洗浄し、乾燥させた。

【0047】このようにして得たフィルムを波長 533 nm および 635 nm のレーザーヘッドを有するドライブ（測定装置）にレーザー光が表面側になるように挿入し、 10 m/分 の速度でフィルムを走行させながら、固定化領域からの蛍光強度を検出、測定した。

【0048】得られた各蛍光強度の結果をデータ処理したところ、Aの相補配列のDNAは固定化Aと、Dの相補配列のDNAは固定化Dと結合することを解析できた。従来一般的な四角形のチップ、ヘッド走査型の測定方法に比べ、検出再現性が良好であり、測定時間はほぼ半減し、感度も所望の位置を繰り返し積算する等により3倍程度向上する。

【0049】実施例2

まず参考例1の基材フィルムの片面を窒素ガスを注入しながらプラズマ放電処理した。次いで、この表面処理したフィルム面に参考例3の穿孔フィルムを重ねてラミネートし、その後、 120°C で1分間処理して熱融着させ、微少穿孔部を有するフィルムを得た。ここで、穿孔フィルムの非疎水化処理面と基材フィルムのプラズマ処理面をラミネート面とした。

【0050】次いで、ここで得られたフィルムにDNAを実施例1と同様に固定化した。市販のDNA溶液A、B、C、D、Eを熱処理後、宝酒造（株）製DNAチップ作製装置 GMSTM417 Arrayerを用いて、10個ずつスポッティングした。この際のDNA固定化位置は、実施例1と同様、 1 cm^2 あたり70個で、大きさは $0.25\text{ mm}\phi$ とし、微少凹部にDNAをスポッティングし、その後、空气中で乾燥し、紫外線を照射することによりDNAを固定した。ここで得られた

DNA固定化フィルムのDNA固定化側の表面の中心線表面粗さは 40 nm であった。

【0051】その後、実施例1同様に標識化したDNAを検体溶液とし、高精度マイクロシリンジポンプを具備したコーティングダイを使用して、前記フィルムに検体溶液を厚み $10\text{ }\mu\text{m}$ の厚さで塗布し、その後、続いて、厚み $50\text{ }\mu\text{m}$ のポリエステル製カバーフィルムをラミネートした。その後、このフィルムを 65°C 、4時間放置し、固定化DNAと検体試料をハイブリダイゼーションさせた後、カバーシートを取り除き、フィルム表面を洗浄バッファーにより室温で数回洗浄し、乾燥させた。

【0052】このようにして得たフィルムを実施例1同様に固定化領域からの蛍光強度を検出、測定した。得られた各蛍光強度の結果をデータ処理したところ、Aの相補配列のDNAは固定化Aと、Dの相補配列のDNAは固定化Dと結合することが解析できた。従来一般的な四角形のチップ、ヘッド走査型の測定方法に比べ、検出再現性が極めて良好であり、測定時間はほぼ半減し、感度も所望の位置を繰り返し積算する等により約10倍程度向上する。

【0053】比較例1、2

フィルムに粒子を添加しないこと以外は参考例2と同様に二軸配向フィルムを作成し、その後、実施例1と同様の方法でDNAを固定化して中心線表面粗さが 0.4 nm のDNA固定化フィルムを得た（比較例1）。また、フィルムに添加する粒子の量を $11\text{ 重量}\%$ に設定する以外は、参考例2と同様に二軸配向フィルムを作成し、その後、実施例1と同様の方法でDNAを固定化して中心線表面粗さが 160 nm のDNA固定化フィルムを得た（比較例2）。

【0054】ここで得られたDNA固定化フィルムを使用して、実施例1同様に、検体溶液と接触させ、ハイブリダイゼーションさせた場合、比較例1では、検出時にシワが発生して検出精度が低下し、実施例1で得られた効果が確認できなくなった。また比較例2では、多量の検体溶液が必要となり、ハイブリダイゼーション反応の効率が低下して検出感度が低下した。

【0055】比較例3、4

DNA固定化領域の密度を 1 cm^2 あたり、 0.5 個または 120 個とする以外は実施例2と同様にDNAの固定化、検体溶液との接触および相互作用、および標識物質の検出を行った。DNA固定化の密度が本発明の範囲を外れる本比較例の場合には、検出の感度が低下して測定時間も長くなり、実施例2で得られた検出感度が全く得られなくなった。

【0056】

【発明の効果】本発明の選択結合性物質固定化フィルムは、検体との接触および相互作用を効果的に実施可能とするものであり、励起放射光の下でフィルムを走行させ

て標識物質を検出する上でも有効である。本発明で開示するフィルムおよびこれを用いた検出方法は、検体中の被検物質の種類および量を高精度、高感度、高効率で測定可能とするものであり、各種被検物質の検出および遺伝子診断分野等において工業的価値が高く、当該分野において大いに活用できる。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の好ましい実施態様の一例を模式的に示す図（フィルム断面図、固定化選択結合性物質は一部分のみを例示）

【図2】本発明の好ましい実施態様の一例を模式的に示す図（フィルム断面図、固定化選択結合性物質は一部分のみを例示）

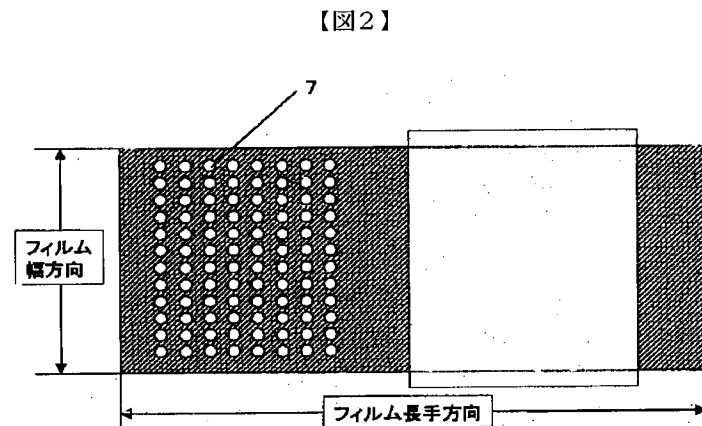
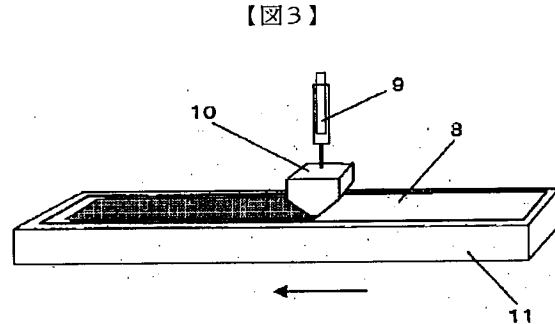
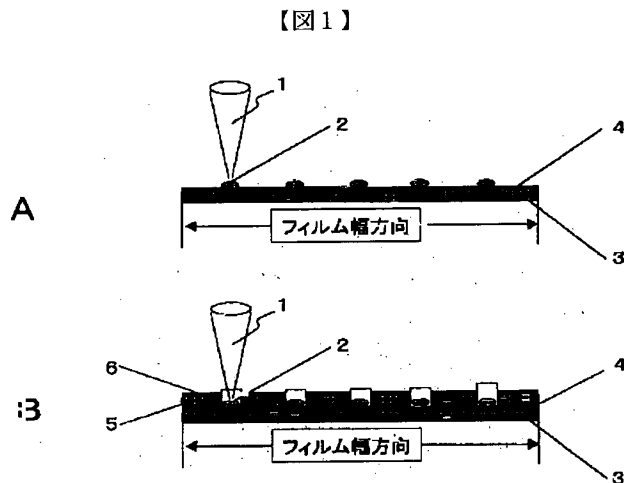
【図3】本発明に用いられる好ましい枚葉型塗工装置の一例を模式的に示す図

【図4】本発明の好ましい連続型塗工装置の一例を模式的に示す図

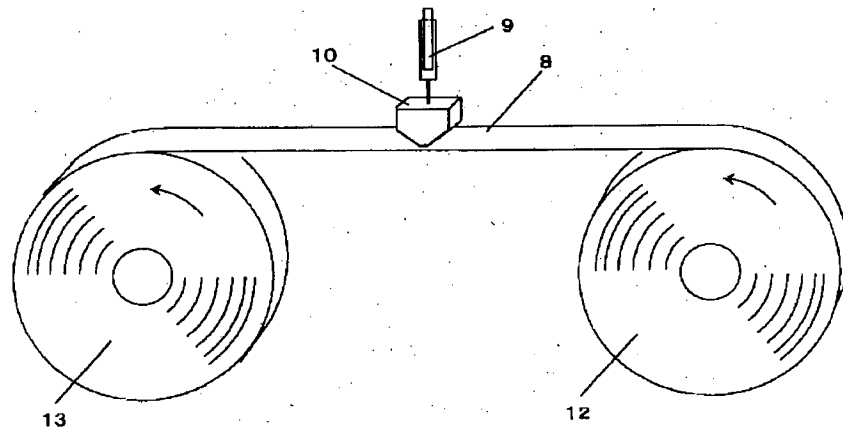
的に示す図

【符号の説明】

- 1 放射励起光
- 2 固定化選択結合性物質
- 3 フィルムA（基板フィルム）
- 4 表面処理層A
- 5 フィルムB（穿孔フィルム）
- 6 表面処理層B
- 7 選択結合性物質固定化領域
- 8 選択結合性物質固定化フィルム
- 9 高精度マイクロシリンジポンプ
- 10 コーティングダイ
- 11 移動テーブル
- 12 巻出リール
- 13 巻取リール



【図4】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	(参考)
G 0 1 N 21/78		G 0 1 N 33/543	5 0 1 D 4 B 0 6 3
33/543	5 0 1	33/566	
33/566		35/02	F
35/02		35/04	F
35/04		37/00	1 0 2
37/00	1 0 2	C 1 2 N 15/00	F

(72)発明者 長井 啓史
滋賀県大津市園山一丁目1番1号 東レ株
式会社滋賀事業場内

Fターム(参考) 2G043 AA01 BA16 CA03 DA02 DA05
EA01 FA01 GA07 GB21 HA01
KA02 KA09 LA01
2G054 AA06 CA22 CE01 EA03 GA03
GA05 GE02
2G058 AA09 CC12 EA11 GA02
4B024 AA19 CA01 CA09 CA11 HA13
HA14
4B029 AA07 AA21 AA23 BB15 BB17
BB20 CC03 CC08 CC11 FA12
FA15
4B063 QA01 QA13 QA17 QA18 QA19
QQ42 QQ52 QQ79 QR32 QR35
QR38 QR48 QR56 QR84 QS33
QS34 QX02